

**ÉTUDE DE L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE
PAR LA MÉTHODE TITRIMÉTRIQUE A pH CONSTANT.
COMPARAISON AVEC D'AUTRES MÉTHODES**

J. GARNIER

avec la collaboration technique de Ghislaine BRIGNON

*Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

ÉTUDE DE L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE PAR LA MÉTHODE TITRIMÉTRIQUE A pH CONSTANT. COMPARAISON AVEC D'AUTRES MÉTHODES (1)

J. GARNIER (2)

avec la collaboration technique de Ghislaine BRIGNON

*Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

L'activité de la présure sur la caséine α suivie par titrimétrie à pH constant est marquée par l'apparition d'un groupe de pK compris entre 4 et 5. On en a conclu que la liaison hydrolysée par la présure était vraisemblablement une liaison ester. $1 \times N$ liaisons esters sont hydrolysées par la présure pour 55 000 g de caséine α , N étant le nombre d'Avogadro. Il existe une relation linéaire entre la quantité de caséino-glycopeptide libéré et la sensibilité au calcium de la caséine entière d'une part, le nombre de liaisons esters hydrolysées dans la caséine α d'autre part. Ainsi l'activité estérasique de la présure sur la caséine α est-elle en relation directe avec l'activité coagulante de l'enzyme.

I — INTRODUCTION

Il est très facile de mesurer l'activité de la présure par son pouvoir coagulant sur le lait ou les solutions de caséinate de calcium. Mais le phénomène de coagulation est complexe, il dépend de nombreux facteurs, si bien que son étude ne donne que des renseignements fragmentaires sur l'activité propre de l'enzyme. Aussi d'autres méthodes d'étude ont-elles été recherchées, en particulier celles mettant en œuvre l'activité protéolytique de l'enzyme. C'est ainsi qu'ALAIS *et al.* (1953) ont pu montrer qu'une très faible proportion de la caséine (1 à 3,5 p. 100) devenait soluble dans l'acide trichloracétique au cours d'une phase d'activité, dite spécifique ou primaire, d'une durée voisine vers 37°C de celle nécessaire à la coagulation. On se trouve ainsi en présence d'une protéolyse limitée, très discrète. Nous avons appliqué à l'étude de cette protéolyse une méthode très sensible : la méthode titrimétrique à pH constant utilisée à l'origine pour l'étude des estérases puis étendue ensuite à celle des peptidases par WALEY et WATSON (1953). Nous avons montré

(1) Une partie de ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des États-Unis (FG-FR-103-61).

(2) Ce travail a été présenté dans une Thèse soutenue en juin 1962 devant la Faculté des Sciences de Paris.

qu'au cours de cette hydrolyse une liaison ester était vraisemblablement rompue (GARNIER, MOCQUOT et BRIGNON, 1962) et nous avons observé des différences de comportement marquées entre la caséine α et la caséine entière (GARNIER, MOCQUOT et BRIGNON, 1962, GARNIER, 1958).

Par comparaison avec d'autres techniques qui permettent de suivre également l'action de la présure, nous avons cherché à établir la relation possible entre cette hydrolyse et la coagulation elle-même.

II — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

21. — PRÉSURE

Nous avons utilisé la présure cristallisée selon la méthode de BERRIDGE (1945). Deux préparations ont été employées : l'une provenant d'une solution stock préparée par C. ALAIS (1955) en tampon phosphate M/20 pH 6,3 et l'autre d'une suspension, en NaCl 2 M, de cristaux de présure Hansen fournie par B. FOLTMANN. Cette suspension de cristaux a été conservée au congélateur à -10°C . Pour préparer une solution stock les cristaux sont dissous dans un tampon phosphate pH 6,3 M/20 et dialysés 36 h contre ce même tampon. La solution est conservée ensuite au congélateur.

La dilution de présure est préparée environ 10 mn avant son emploi en diluant dans l'eau distillée une partie aliquote de la solution stock décongelée. Nous avons observé que les décongelations répétées de cette solution entraînaient une baisse du titre de la présure d'environ 1 à 2 p. 100 à chaque décongelation. Pour éviter cet inconvénient nous avons réparti au préalable la solution stock, à raison de 0,15 ml, en petits tubes à essais. Ceci a l'avantage de décongeler une seule fois la solution stock nécessaire à la préparation d'une dilution pour un essai. Dans ces conditions le titre de la présure est stable pendant plusieurs mois.

Tous les deux mois, un contrôle du pouvoir coagulant est effectué de la manière suivante : dans un tube à essai 18/180 maintenu au bain-marie à 35°C on ajoute 11 ml de lait entier, de mélange, préalablement réchauffé à 35°C (pipette à écoulement rapide), à 0,5 ml d'une dilution de présure. On bouche le tube avec un bouchon, on le retourne 3 fois et, environ 20 secondes avant la coagulation, on incline et on tourne très lentement le tube de façon à observer les premiers flocons sur une mince pellicule de lait. Le temps de coagulation, t' , exprimé en secondes, est comparé à celui obtenu avec une présure en poudre servant de témoin, t , et titrant 457 Unités présure/gramme.

L'unité présure (*U. P.*) que nous utilisons a été définie par BERRIDGE (1945) comme la quantité de présure, contenue dans 1 ml qui coagule 10 ml d'un substrat standard (lait en poudre reconstitué) en 100 secondes à 30°C . Comme à 30°C la proportionnalité entre le temps de coagulation et la concentration en présure est moins bonne qu'à 35°C nous avons préféré effectuer nos titrages à 35°C et nous servir du titre de 457 *U. P.*/g de présure témoin établi par C. ALAIS (1955, et communication personnelle).

La présure témoin est une présure commerciale « Hansen ». Nous conservons une réserve de cette présure et celle-ci est renouvelée tous les ans, le nouveau lot étant étalonné par rapport au précédent. En fait, tous les lots de présure Hansen reçus ont présenté le même titre (ALAIS, communication personnelle). Les dilutions de présure sont faites de telle sorte que les temps de coagulation soient de l'ordre de 4 à 5 minutes. Le nombre d'unités présure, x par ml, a été calculé en écrivant que le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en présure selon STORCH et SEGELCKE (1874) :

$$\frac{457 d}{x d'} = \frac{t'}{t} \quad \text{ou} \quad x = 457 \frac{d}{d'} \times \frac{t}{t'}$$

dans laquelle : d est la dilution de la présure étalon (nombre de grammes, pour une présure en poudre, par ml de volume final de la dilution)

d' est la dilution de présure à titrer.

La concentration en présure, exprimée en γ/ml , a été calculée soit par dosage de l'azote au

microKjeldahl ($N \times 6,38$) soit par mesure de l'absorption à $278 \text{ m}\mu$ en utilisant le coefficient d'extinction $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mg/ml}} = 1,58$ en tampon phosphate pH 6,3 M/20 communiqué par B. FOLTMANN. Nous avons utilisé comme poids moléculaire de la présure 40 000 d'après SCHWANDER, ZAHLER et NITSCHMANN (1952) et nous avons observé que 21 γ de la présure fournie par C. ALAIS correspondaient à 1 U.P. contre 12 γ de la présure fournie par B. FOLTMANN.

22. — CASÉINE ENTIÈRE

Les différentes préparations de caséine ont été effectuées à partir du lait écrémé de mélange provenant du troupeau des vaches laitières du C. N. R. Z. Nous avons utilisé deux techniques de préparation de la caséine entière.

221.) Précipitation isoélectrique

C'est la méthode la plus ancienne ; elle a été l'objet de nombreux travaux en particulier ceux d'HAMMARSTEN (1883), et elle consiste à précipiter le lait à pH 4,7, puis à redissoudre la caséine à pH 7. Cette opération est répétée à nouveau trois fois en lavant soigneusement chaque fois le précipité à l'eau distillée. Nous avons abandonné la technique habituelle de séchage du précipité par traitement à l'alcool, puis à l'éther. Nous avons préféré lyophiliser la solution de caséinate à pH 7. Ce procédé a l'avantage de fournir une caséine facilement soluble dans l'eau distillée. De plus, le traitement à l'alcool amorce le début d'un fractionnement de la caséine, une certaine quantité de cette caséine étant soluble dans la première solution de lavage à l'alcool.

222.) Précipitation par le calcium

Nous avons séparé la caséine du lait par centrifugation selon MOCQUOT *et al.* (1954) d'après la technique de VON HIPPEL et WAUGH (1955, 1958) qui consiste à centrifuger à 45 000 g et à 37°C les micelles de caséine du lait. Les micelles centrifugées sont dissoutes dans une solution de citrate de potassium 0,1 M pH 6,5, puis dialysées et lyophilisées. On obtient ainsi une caséine aisément soluble dans l'eau distillée que WAUGH a appelée, caséine soluble ou encore caséine 1^{er} cycle par opposition à la préparation obtenue par une deuxième précipitation par le calcium (caséine 2^e cycle) dont les propriétés sont très différentes de la caséine entière ou caséine 1^{er} cycle.

Les concentrations en caséine entière ont été déterminées par dosage de l'azote par microKjeldahl en multipliant la quantité d'azote trouvée par le facteur conventionnel 6,38.

23. — CASÉINE α

Nous avons préparé la caséine α selon la technique décrite par MCKENZIE et WAKE (1961). Le surnageant de précipitation par le calcium de la caséine entière est précipité à son tour par l'acétate d'ammonium en milieu alcoolique.

Cette méthode revient à appliquer à ce surnageant dépourvu de caséine α le processus de préparation de la caséine α d'HIPP *et al.* (1952).

Nous avons déterminé le coefficient d'extinction en mesurant la densité optique à 278μ d'une solution de caséine α dialysée pendant 3 jours contre une solution de NaCl 0,15 ou 0,3 M additionnée d'imidazole à la concentration de 0,002 M en changeant la solution de dialyse chaque jour. La dialyse contre une solution de NaCl a été employée pour réduire l'effet Donnan, l'imidazole pour éviter une baisse trop forte du pH. Les extraits secs ont été obtenus après dessiccation sous vide pendant 24 h à 110°C, et nous avons déduit de l'extrait sec d'une partie aliquote de la solution dialysée, l'extrait sec de la solution de dialyse. Les mesures d'absorption à 278μ ont été faites en tampon phosphate pH 6,9 $\mu = 0,1$ et nous avons trouvé $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mg/ml}} = 1,05 \pm 0,05$ moyenne de 4 mesures. Cette valeur de E nous a servi pour calculer les concentrations en caséine α . Le poids moléculaire a été pris égal à 26 000 d'après MCKENZIE et WAKE (1959).

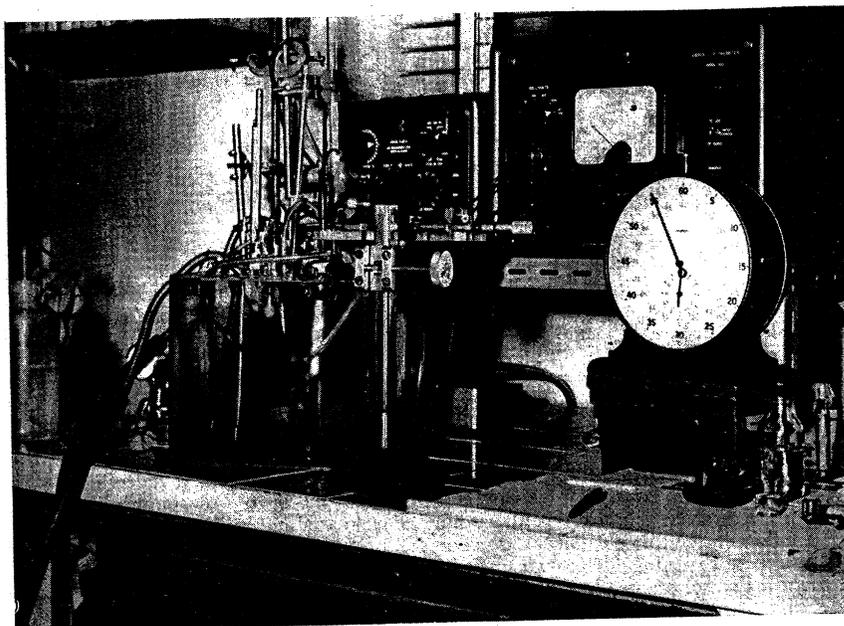


FIG. 1

Vue d'ensemble de l'appareillage utilisé pour la mesure des protons libérés par titrimétrie à pH constant.

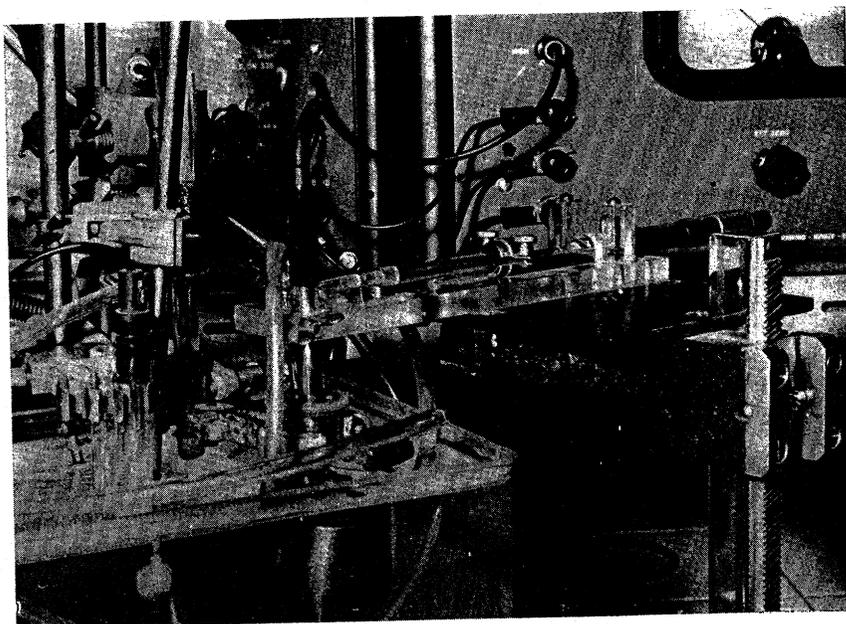


FIG. 2

Vue de détail montrant le dispositif expérimental de titration pour la mesure des protons libérés par titrimétrie à pH constant.

24. — MÉTHODE TITRIMÉTRIQUE A pH CONSTANT

Si, lors de la coupure par l'enzyme d'une liaison covalente, il apparaît un groupe ionisable, celui-ci peut libérer des protons dans le milieu ou en fixer, suivant sa nature et suivant les conditions de pH. Au cours de la protéolyse le pH est maintenu constant dans le cas présent par addition de soude. La quantité de soude ajoutée est directement proportionnelle au nombre de nouveaux groupes ionisables, c'est-à-dire en général au nombre de liaisons rompues.

Nous utilisons un pH-mètre Vibron (E. I. L.), très stable (sa dérive propre est inférieure à $2 \cdot 10^{-3}$ unité pH en 12 h) et très sensible (il permet d'apprécier une variation de $5 \cdot 10^{-4}$ unité pH) (voir fig. 1). 8 ou 5 ml de la solution à étudier sont placés dans une cuve cylindrique spéciale d'un diamètre intérieur de 20 mm et d'une hauteur de 40 mm, à deux orifices (voir fig. 2 et 3). Par l'orifice latéral arrive un courant d'azote très pur, dépourvu de CO_2 , à débit constant (250 ml/min) et humidifié par barbottage dans un flacon d'eau distillée. Par l'autre orifice plongent l'électrode de verre blindée, le pont de KCL de l'électrode au calomel et la pointe capillaire de la microseringue « Agla ».

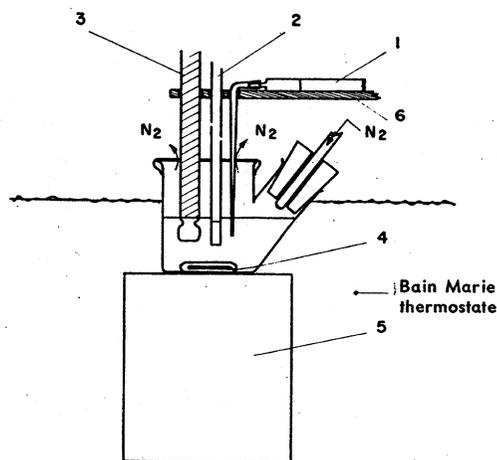


FIG. 3. — Schéma du dispositif expérimental de titration.

- 1 — Microseringue « Agla » ;
- 2 — Pont KCL de l'électrode au calomel
- 3 — Électrode de verre blindée ;
- 4 — Barreau aimanté ;
- 5 — Agitateur magnétique ;
- 6 — Support monté sur crémaillère.

Ces éléments sont solidaires et montés sur un support à crémaillère. La cuve, l'électrode au calomel et le flacon servant à humidifier l'azote sont placés dans un bain-marie dont la température est constante à $\pm 1/100$ de degré près. L'agitation à l'intérieur de la cuve cylindrique est réalisée à l'aide d'une aiguille de fer enrobée de verre, actionnée par un agitateur magnétique « Camlab » à vitesse variable placé en dessous de la cuve, dans l'eau. L'agitateur magnétique et le pH-mètre sont reliés à une même prise de terre.

Le pH-mètre est d'abord étalonné à l'aide d'un tampon phosphate pH 6,96 $\mu = 0,1$ (phosphate disodique 0,0275 M et phosphate monopotassique 0,0225 M). La dérive propre du pH-mètre est toujours négligeable et constante devant la variation spontanée du pH des solutions étudiées dont l'équilibre de pH est long à s'établir. On considère que cet équilibre est atteint quand la dérive observée — en général vers les pH alcalins — est inférieure ou égale à $1 \cdot 10^{-3}$ unité pH en 5 minutes, soit au bout de 20 à 30 minutes pour la solution tampon. On remplace alors le tampon par la solution à étudier. Après 15 à 20 minutes, cette solution est ajustée à 0,1 unité pH au-dessous du pH désiré par addition de HCl N/10 ou NaOH N/10 à l'aide d'une pipette de 0,1 ml graduée en μl . Quand la dérive est à nouveau inférieure à 10^{-3} unité pH toutes les 2-3 minutes, ce qui demande encore environ une heure, le pH est ajusté à la valeur désirée par addition de soude N/100 à l'aide de la micro-

seringue « Agla ». Après avoir vérifié pendant 1 à 2 minutes que la dérive est toujours inférieure ou égale à 10^{-3} unité pH/2-3 minutes, on ajoute à l'aide d'une pipette à striction 0,05 ml de la dilution de présure préalablement portée à la température de l'expérience et l'on déclenche le chronomètre. Il est recommandé de ne pas différer l'addition de présure quand l'équilibre défini ci-dessus est atteint car cet équilibre est transitoire : il dure environ 1 h, puis à nouveau une dérive est observée, cette fois vers les pH acides. Aux pH supérieurs à 6,3 l'addition de présure conduit toujours à une légère baisse de pH, d'environ 10^{-2} unité pH, que l'on compense par l'addition d'une certaine quantité de soude N/100. On ajoute ensuite un peu de soude N/100 de façon à dépasser le pH fixé de 0,5 à $1 \cdot 10^{-3}$ unité pH et on note le temps au bout duquel l'aiguille du pH-mètre revient au pH initial ; on ajoute alors une nouvelle quantité de soude N/100 et on note à nouveau le temps au bout duquel l'aiguille revient au même pH et ainsi de suite. On peut alors tracer, en fonction du temps, la quantité de soude nécessaire pour maintenir le pH constant et cette quantité est égale au nombre de protons libérés dans le milieu au cours de la réaction. Le premier point est obtenu après 30 à 45 secondes et il est possible de faire des mesures toutes les 10-15 secondes. Le point initial est déterminé par extrapolation de la courbe au temps zéro.

Pour étudier l'action de la présure sur la caséine entière étant donné la variation extrêmement faible du pH, 0,5 à $1 \cdot 10^{-2}$ unité pH, comparée à celle enregistrée avec la caséine κ : 5 à $10 \cdot 10^{-2}$ unité pH, nous avons suivi la réaction en notant seulement le pH. Nous avons vérifié que le pouvoir tampon, $2,7 \cdot 10^{-4}$ mole OH⁻/g caséine entière/unité pH à pH 6,9, est constant sur $5 \cdot 10^{-2}$ unité pH. Il est par suite possible de transformer la variation du pH observée en protons libérés.

25. — MÉTHODE DE PRÉCIPITATION PAR LE CALCIUM

La caséine entière a la propriété de s'associer sous forme de micelles en présence d'ions divalents, particulièrement de calcium. Pour des concentrations de Ca⁺⁺ de l'ordre de 0,05 à 0,1 M les solutions de caséine prennent un aspect « laiteux » mais ne précipitent pas. La stabilité de ces micelles est remarquable et von HIPPEL et WAUGH (1955) ont montré qu'elles sont en équilibre avec des formes polymères de la caséine en solution. Après action de la présure, ces micelles forment un coagulum ; il en est de même si, à une solution de caséine entière, on ajoute du calcium après action de la présure. Nous avons utilisé cette dernière propriété pour voir si, au cours de la réaction, il y avait une augmentation progressive de caséine précipitable par le calcium ou paracaséine.

A 2 ml de solution de caséinate de sodium placés dans un tube de centrifugeuse maintenu à 30°C, on ajoute 0,1 ml d'une dilution de présure. Au bout d'un temps déterminé on plonge ce tube dans un bain de sable porté à 350°-450°C pendant 10 secondes en agitant la solution ; c'est le temps nécessaire pour élever la température de la solution de 30 à 80°C. Puis on agite la solution pendant à nouveau 10 secondes hors du bain de sable et on refroidit sous l'eau du robinet pendant 30 secondes. A la solution refroidie on ajoute 1 ml d'une solution de CaCl₂ 0,09 M, on agite, on laisse au bain-marie à 30°C pendant 15 minutes et on centrifuge 15 minutes à 700 g. On dose l'azote du surnageant par microKjeldahl.

26. — MÉTHODE DE PRÉCIPITATION TRICHLORACÉTIQUE

En solution aqueuse la plupart des protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique ; seuls les acides aminés et certains polypeptides restent en solution. Comme la protéolyse est faible, nous avons déterminé les produits solubles dans l'acide trichloracétique pour éviter un « blanc » élevé (ALAIS et al. 1953). Nous avons dosé l'azote, car les produits libérés par la présure, n'absorbent pas à 280 m μ et une mesure spectrophotométrique à cette longueur d'onde ne peut donc apporter un résultat.

Dans un erlenmeyer de 30 ml placé au bain-marie on ajoute à 6 ou 10 ml de substrat, 0,05 ou 0,1 ml d'une solution de présure à l'aide d'une pipette à striction jaugée. Au bout d'un temps donné d'action de la présure, on arrête la réaction en ajoutant 2 ml d'une solution concentrée d'acide trichloracétique calculée pour obtenir une concentration déterminée en acide trichloracétique du mélange final. Cette addition est faite à l'aide d'une seringue jaugée de 2 ml (rhéomètre de VERNES). Le piston et le corps de pompe de cette seringue sont en verre. Son emploi permet l'addition rapide du réactif et assure une excellente reproductibilité des mesures de volumes ($\pm 0,3$ p. 1000). Le mélange est agité puis filtré au bout de 10 minutes sur filtre Durieux à bande blanche, filtration courante, de 55 mm de diamètre. L'azote est dosé sur 3 ou 4 ml du filtrat, en double, par microKjel-

dahl. Les teneurs en azote du filtrat sont déterminées en tenant compte du volume du précipité : cela revient à multiplier les teneurs en azote du filtrat par le coefficient

$$c = 1 - (NT - N. P. N.) \times 6,38 \times \frac{0,75}{1000}$$

NT et N. P. N. représentant respectivement les teneurs en azote total et en azote non protéique du mélange enzyme-substrat + acide trichloracétique.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

3I. — ÉTUDE CRITIQUE DES MÉTHODES

3II) Méthode titrimétrique à pH constant

La méthode est d'autant plus sensible que les mesures sont effectuées à un pH très au-dessus du pK du groupe ionisable, en pratique à deux unités pH au-dessus de ce pK.

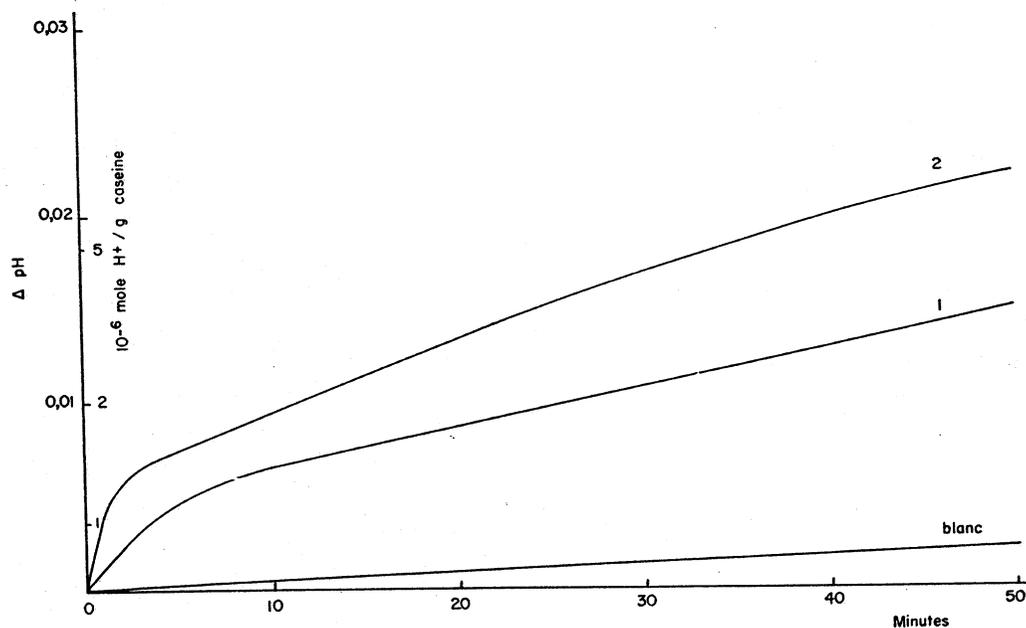


FIG. 4. — Nombre de protons libérés au cours de l'action de la présure sur la caséine entière à pH 6,95 et à 25°C

Courbe 1 $s = 22$ mg/ml, $e = 0,066$ U. P./ml (1,4 γ /ml);

Courbe 2 $s = 22$ mg/ml, $e = 0,66$ U. P./ml (14 γ /ml).

En ordonnées : variation du pH observé ou mole de H^+ par gramme de caséine entière ;
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

Les résultats obtenus à pH 6,95 pour deux concentrations différentes de présure ont été représentés dans la figure 4 pour la caséine entière et dans la figure 5 pour la caséine α . On peut remarquer que la caséine α se montre relativement sen-

sible à l'action de la présure comparée à la caséine entière : dix fois plus environ de nouveaux groupes ionisables ou protons libérés sont titrés. Cette sensibilité de la caséine κ à l'action de la présure avait déjà été signalée par la méthode de précipitation trichloracétique (GARNIER, 1957, WAKE, 1957). Pour de plus fortes concentrations en présure (courbes 2 des figures 4 et 5), la réaction se poursuit ensuite par une faible protéolyse qui correspond à la phase secondaire de l'activité de l'enzyme (NITSCHMANN et BOHREN, 1955).

Étant donné le petit nombre de protons libérés, l'appareillage, quoique très sensible, est utilisé aux limites de ses possibilités ce qui rend les mesures délicates. Ces mesures sont faites dans des intervalles de pH où les variations du potentiel de jonction de l'électrode au calomel, la stabilité de l'électrode de verre et

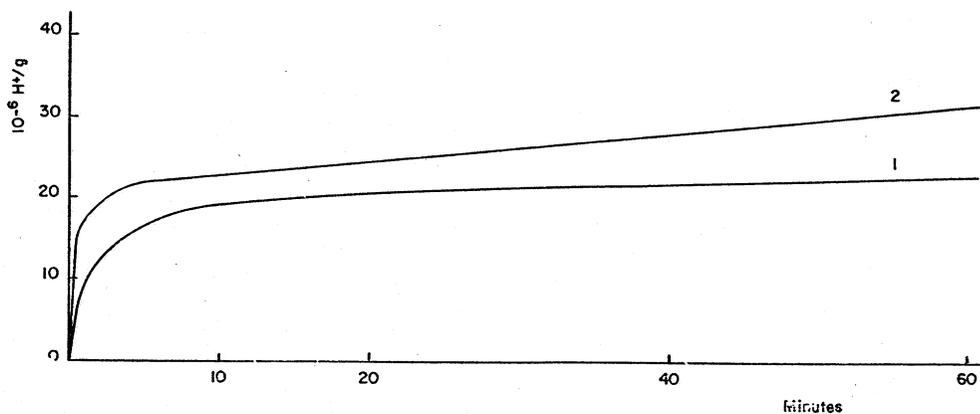


FIG. 5. — Nombre de protons libérés au cours de l'action de la présure sur la caséine κ à pH 6,95 et à 25°C

Courbe 1 $s = 3,7$ mg de caséine κ/ml , $e = 0,086$ U. P./ml (1 γ/ml);

Courbe 2 $s = 5,2$ mg de caséine κ/ml , $e = 5,2$ U. P./ml (62,5 γ/ml).

En ordonnées : mole de H^+ par gramme de caséine κ ;

En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

des solutions protéiques ne sont plus tout à fait négligeables et il faut attendre un temps assez long pour qu'un équilibre soit atteint. Pour accroître la sensibilité de la méthode il est nécessaire de travailler dans un milieu où seule la protéine étudiée constitue le tampon et où la force ionique est suffisante, aussi avons-nous utilisé une concentration en NaCl de 0,1 M. L'erreur maximum sur la mesure d'une vitesse initiale est, par exemple, d'environ ± 10 p. 100 mais la reproductibilité des essais en double est souvent meilleure et de l'ordre de ± 5 p. 100.

Néanmoins elle représente une méthode de mesure continue et très rapide de l'activité de l'enzyme. Elle nécessite de faibles quantités de caséine : environ 10 à 50 mg pour un essai.

312) Méthode de précipitation par le calcium

Cette méthode a l'avantage de présenter d'une manière cinétique l'action de la présure sur la caséine en utilisant une propriété fondamentale de la paracaséine: son instabilité vis-à-vis du calcium (voir fig. 6). Elle a l'inconvénient de ne pas

s'appliquer à la caséine α , insensible au calcium, et aussi celui d'être peu précise. De plus une partie de la caséine entière (17 à 19 p. 100) sédimente par centrifugation avant toute action de la présure. Enfin au cours de la réaction, un des produits de cette réaction, le caséino-glycopeptide, s'ajoute à la caséine non précipitée. Cependant, la quantité de caséino-glycopeptide formé est suffisamment faible au début de la réaction pour être négligeable.

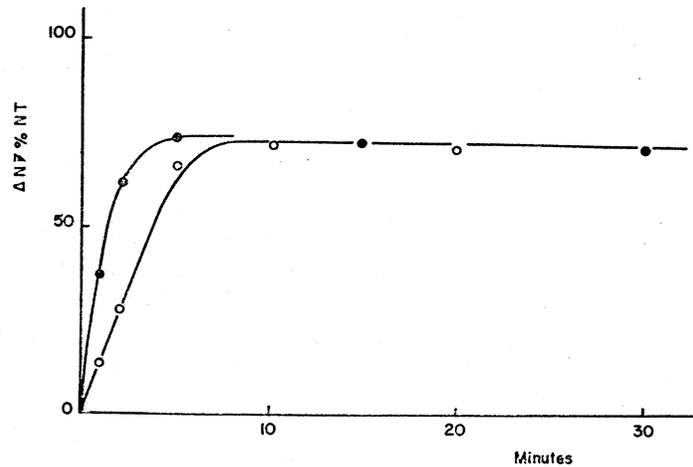


FIG. 6. — Augmentation de l'azote précipité par le calcium au cours de l'action de la présure sur la caséine entière

Concentration en caséine entière : 27 mg/ml,

Concentration en présure ● —● 0,16 U. P./ml (3,3 γ /ml)

○ —○ 0,08 U. P./ml (1,6 γ /ml),

Température : 30°C, pH 6,9.

En ordonnées : azote précipité par le calcium exprimé en pourcent de l'azote total, déduction faite de l'azote précipité au temps zéro.

En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

313) Méthode de précipitation trichloracétique

Plusieurs éléments interviennent dans le choix de la concentration finale en acide trichloracétique. Tout d'abord il faut que cette concentration soit suffisamment élevée pour que la réaction de protéolyse soit inhibée. Or nous avons observé que pour les faibles concentrations, il y avait toujours un écart entre la valeur de protéolyse au temps zéro (obtenue avec la présure inactivée par chauffage), et celle du temps immédiatement voisin, si réduit que soit l'intervalle les séparant. La figure 7 représente la quantité d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 en fonction du temps séparant la défécation de la filtration, lorsque la présure est ajoutée en même temps que l'acide trichloracétique. La quantité d'azote soluble est faible mais elle croît avec le temps et d'autant plus vite que la concentration en présure est élevée. Elle est certainement en relation avec une activité résiduelle de la présure sur une protéine insoluble, en milieu trichloracétique. Il ne semble pas que ce soit une solubilisation progressive des produits de la réaction, d'abord parce qu'ils doivent être inexistantes si les additions d'enzyme et d'agent déféquant sont bien simultanées, et ensuite parce qu'après 10 et 60 minutes de protéolyse, on n'observe plus cette augmentation de l'azote soluble alors que les produits de la réaction

tion sont au contraire plus abondants. Nous avons déterminé qu'il fallait une concentration finale en acide trichloracétique d'au moins 5 p. 100 pour inhiber l'activité résiduelle de la présure (voir fig 8). Il semble d'autre part que cette activité résiduelle soit d'autant plus marquée que l'acide trichloracétique ajouté est plus dilué pour une même concentration finale.

Mise à part cette activité résiduelle qui est faible et n'affecte que les vitesses initiales, ALAIS, et al. (1953) avaient déjà montré une différence entre les

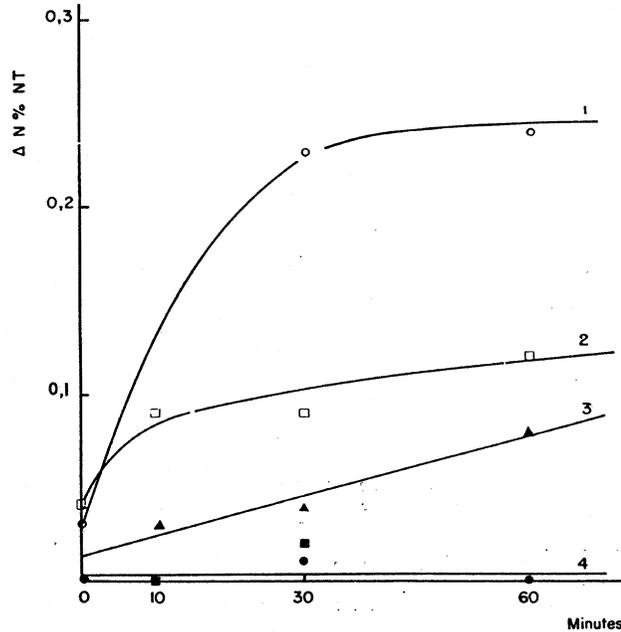


FIG. 7. — *Activité résiduelle de la présure dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100*

Concentration en caséine entière : $s = 27,6$ mg/ml,

Concentration en présure :

courbe 1 ○—○ $e = 0,086$ U. P./ml (1,8 γ /ml);

courbe 2 □—□ $e = 0,043$ U. P./ml (0,9 γ /ml);

courbe 3 ▲—▲ $e = 0,017$ U. P./ml (0,36 γ /ml);

courbes 4 ●—● $e =$ présure inactivée par ébullition ;

■—■ même essai que celui représenté par la courbe 2 mais après 10 mn d'action de la présure.

Température : 25°C.

En abscisses : temps séparant la filtration de la défécation en minutes;

En ordonnées : augmentation de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 en pourcent de l'azote total.

courbes de libération d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 et à 12 p. 100. NITSCHMANN et BOHREN (1955) ont repris cette étude et ils ont nettement distingué, dans le cours de la réaction, une protéolyse primaire et une protéolyse secondaire. La protéolyse primaire est constituée par une libération rapide de produits azotés solubles dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, libération caractéristique semble-t-il du phénomène de coagulation. En effet ce type de protéolyse d'après MATTENHEIMER et NITSCHMANN (1955) est retrouvé avec des enzymes autres que la présure ayant une activité coagulante, en particulier la pepsine. La protéolyse

secondaire n'est visible qu'avec des concentrations d'acide trichloracétique inférieures à 12 p. 100 ; en particulier à 2 p. 100, elle est donnée par tous les enzymes protéolytiques et ne semble donc pas spécifique de la coagulation. Enfin elle est peu importante sauf aux pH très acides.

Nous avons donc choisi d'étudier la relation existant entre l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et les autres techniques. Il se trouve que, d'après

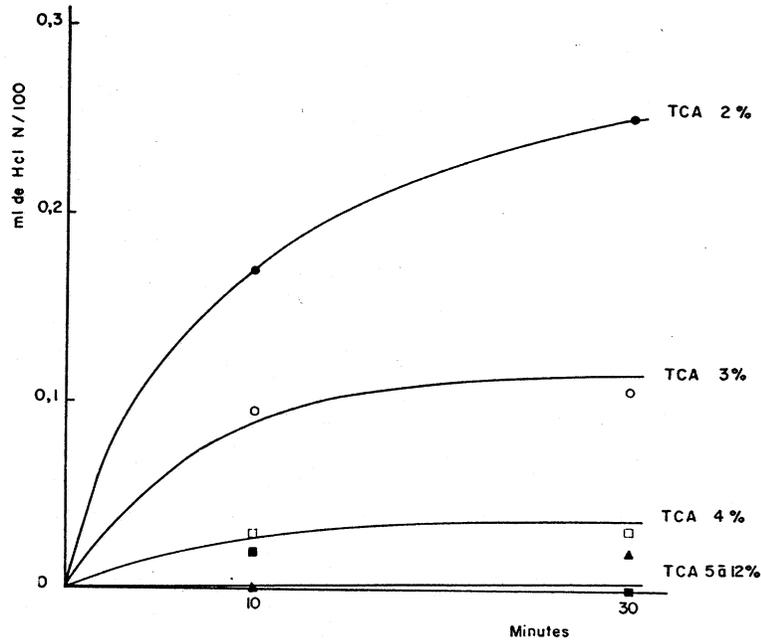


FIG. 8. — *Activité résiduelle de la présure en fonction de la concentration en acide trichloracétique*

Concentration en caséine entière : 13 mg/ml,
Concentration en présure : 0,35 U. P./ml (4,2 γ /ml),
Température : 23°C.

En abscisses : temps séparant la filtration de la défécation ;

En ordonnées : azote soluble dans le filtrat trichloracétique exprimé en valeur relative en ml d'acide chlorhydrique N/100 blanc déduit.

ALAIS (1956), cette matière azotée soluble est une substance homogène bien définie appelée caséino-glycopeptide et dont la composition et la structure ont déjà été étudiées par NITSCHMANN et HENZI (1959), NITSCHMANN et BEEBY (1960) et par JOLLES et ALAIS (1961). Ces auteurs ont trouvé pour cette substance la même composition peptidique, qu'elle soit préparée à partir de la caséine α (dont elle provient en fait) ou à partir de la caséine entière.

La méthode de précipitation trichloracétique est une méthode précise mais demandant la mise en œuvre de grandes quantités de substrat, la protéolyse étant très faible. C'est aussi une méthode longue puisqu'il faut passer par l'intermédiaire de nombreuses déterminations d'azote organique.

32. — COMPARAISON ENTRE LES MÉTHODES

321) Comparaison entre la méthode titrimétrique et la méthode trichloracétique

La figure 9 montre la relation trouvée à pH 6,95 entre la libération du caséino-glycopeptide, exprimé en azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, et les protons libérés à partir de la caséine κ . Il existe une relation linéaire entre les deux

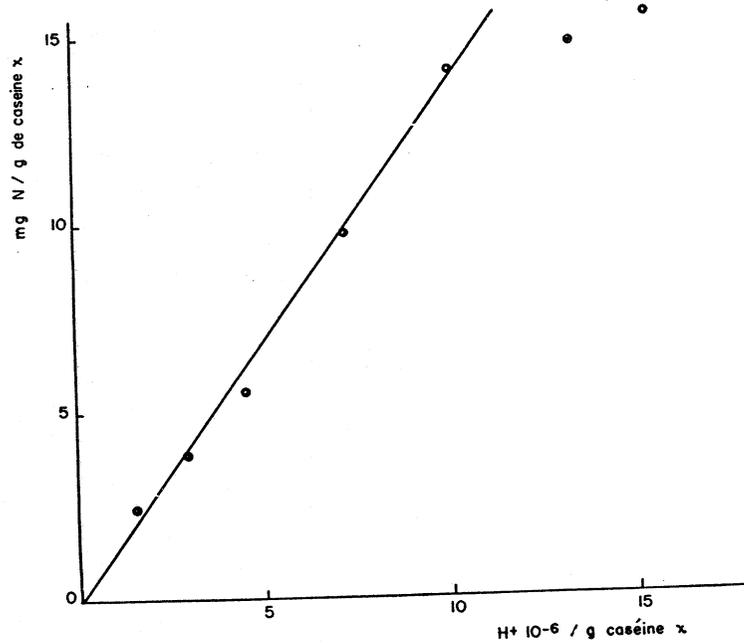


FIG. 9. — Relation entre l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et les protons libérés

Concentration en caséine κ : 5 mg/ml;
 Concentration en présure : 0,008 U. P./ml (0,09 γ /ml);
 Température : 40°C.

En ordonnées : accroissement en mg de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 par g de caséine κ (blanc déduit);
 En abscisses : mole de protons libérés par g de caséine κ .

phénomènes jusqu'à environ 70 p. 100 de la protéolyse. Pendant cette période, 1 200 \pm 150 g d'azote sont libérés par mole de protons. Comme cet azote ne représente qu'environ la moitié de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 on peut en déduire que le poids moléculaire moyen des produits de la réaction par mole de protons est très élevé. On sait déjà d'ailleurs que le caséino-glycopeptide a un poids moléculaire de l'ordre de 8 000 d'après NITSCHMANN, WISSMANN et HENZI (1957) et de 15 600 d'après BRUNNER et THOMPSON (1959).

322) — *Comparaison entre la méthode trichloracétique et la précipitation de la caséine entière par le calcium*

Compte tenu des erreurs d'expériences indiquées pour chaque point de la courbe représentée figure 10, il y a proportionnalité entre la quantité de caséino-glycopeptide libéré et la quantité de caséine précipitable par le calcium, sauf en fin de réaction. Mais il faut alors noter que, par centrifugation, on précipite toutes les particules à partir d'une certaine taille et qu'on ne peut plus suivre ainsi la réaction à partir du moment où toutes les particules ont atteint ou dépassé cette taille limite. Cette

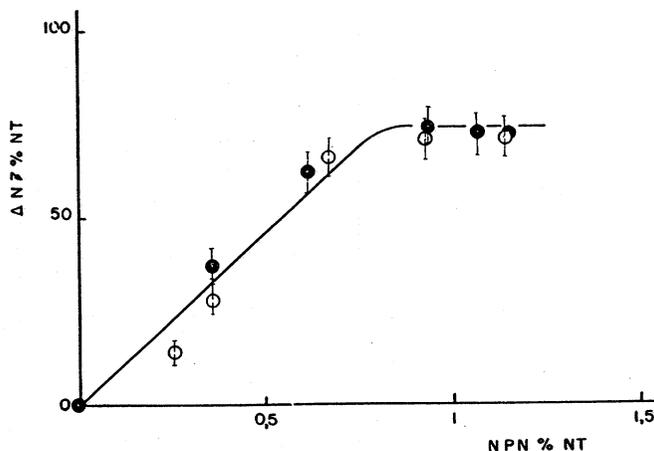


FIG. 10. — Relation entre l'augmentation de l'azote non protéique soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 (N. P. N.) et l'accroissement de l'azote précipité par le calcium au cours de l'action de la présure ($\Delta N \downarrow$) exprimés en pourcent de l'azote total.

Solution de caséine entière : $s = 29$ mg/ml ;
 Présure cristallisée : \circ $e = 0,08$ U. P./ml (1,6 γ /ml),
 \bullet $e = 0,16$ U. P./ml (3,3 γ /ml),
 Température 30°C ; pH 6,9.

corrélation entre les deux phénomènes confirme bien les conclusions de MATTENHEIMER et NITSCHMANN (1955) et de NITSCHMANN et KELLER (1955) concernant la relation qui doit exister entre la protéolyse primaire ou libération du caséino-glycopeptide et la coagulation.

33 — INFLUENCE DU pH SUR LA MESURE DES PROTONS LIBÉRÉS

Pour identifier et dénombrer les groupes ionisables nous avons mesuré, à différents pH, les protons libérés.

La figure 11 représente deux courbes typiques de libération de protons, à pH 5,4 et 7,4. Nous avons indiqué par des flèches la période de précipitation de la caséine α , la première flèche coïncide avec le début de l'opacification et la deuxième avec l'apparition des grumeaux. On remarquera que la durée de ce phénomène et le moment de son apparition dépendent beaucoup du pH. Dans nos

expériences la vitesse initiale est d'autant plus grande que les valeurs du pH sont plus faibles, ce qui correspond au fait que le pH optimum d'action de la présure est situé vers 4. Pour les pH inférieurs à 6, quand la précipitation est très rapide, on observe un décrochement passager dans le tracé de la courbe de libération des protons (voir fig 11). Nous

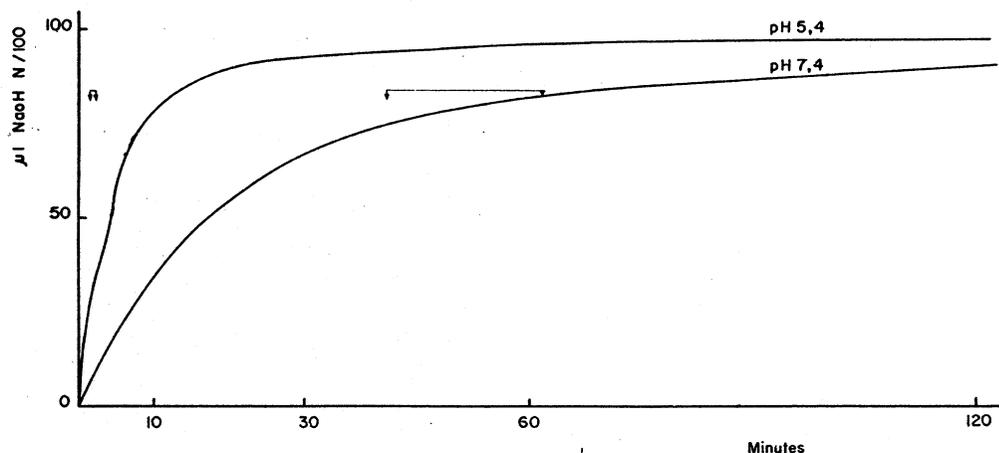


FIG. 11. — Action de la présure sur la caséine α à pH 5,4 et 7,4

Concentration en caséine α : $s = 6,4$ mg/ml,
Concentration en présure : $e = 0,15$ U. P./ml (1,8 γ /ml),
Température : 25°C.

En ordonnées : nombre de protons libérés exprimés en valeur relative en μl de NaOH N/100 utilisés pour maintenir le pH constant.
En abscisses : temps en minutes.

avons vérifié par ailleurs que les quantités de caséino-glycopeptide libérées en fin de réaction ne variaient pas non plus d'une manière significative. Exprimées en pourcent de l'azote total, elles s'élèvent à 12,8 p. 100 à pH 5,4, 11,6 p. 100 à pH 6,9 et à 11,9 p. 100 à pH 7,4. Nous avons reporté dans le tableau 1 les différentes valeurs des protons

TABLEAU I

Variations du nombre de protons libérés avec le pH

pH	$10^{-5} \text{ H}^+/\text{g}$
7,4	1,87 (1,66 ; 1,37 ; 2,56)
6,9	1,85
6,4	2,0
5,9	1,93
5,4	1,90 (2,0 ; 1,81)
3,2	0

libérés en fin de réaction à différents pH. En fait, comme nous l'avons vu, une faible protéolyse, appréciable seulement avec de fortes doses de présure (fig 5, courbe 2) se produit encore après le point que nous considérons comme marquant la fin de la réaction. Nous avons indiqué entre parenthèses, aux pH extrêmes, les valeurs

individuelles pour chaque expérience. Il y a une assez forte variation en particulier à pH 7,4, cela est dû au fait que ces mesures sont réalisées au bout d'un temps assez long et qu'alors la dérive du pH de la solution n'est plus négligeable ni très reproductible.

La caséine κ est insoluble entre pH 5,4 et 3,3 ; aussi n'avons-nous pas mesuré les protons libérés dans cette zone de pH. Cependant, à pH 3,2, nous avons obtenu, avec difficulté, une solution de caséine κ à laquelle nous avons ajouté de la présure : aucune libération de protons n'a été observée, bien que la caséine κ ait été effectivement transformée en paracaséine κ . Ce dernier point a été vérifié, d'abord en observant que la paracaséine κ est soluble à pH 3,2 et (contrairement à la caséine κ) conserve sa solubilité jusqu'à pH 4,4 environ ; ensuite en neutralisant (par addition de soude N/10) jusqu'à pH 7 et en observant alors la formation immédiate du précipité fibrillaire, caractéristique de la paracaséine κ .

TABLEAU 2

Nombre de protons libérés à pH 6,9

Température	Concentration en présure U.P./ml	10^{-5} H ⁺ /g
25°C	0,06	1,78
	0,10	2,67
	0,10	2,25
	0,14	2,29
	0,15	1,35
	0,15	1,55
	0,15	1,57
	0,15	1,96
	0,8	2,12
	35°C	0,06
40°C	0,08	1,55

Nous avons indiqué, dans le tableau 2, les différentes valeurs du nombre de protons libérés pour différentes préparations de caséine κ et pour différentes conditions de température et de concentration en enzyme. La moyenne de ces résultats est $1,85 \cdot 10^{-5}$ H⁺/g de caséine κ et l'écart type s' sur la moyenne,

$$s' = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x)^2}{n(n-1)}} = 0,13 \cdot 10^{-5} \text{ H}^+/\text{g},$$

95 p. 100 des mesures sont donc comprises entre $1,45$ et $2,15 \cdot 10^{-5}$ H⁺/g. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les diverses préparations (5 au total) de caséine κ étudiées.

Dans la figure 12, nous avons réuni les résultats, très éloignés des précédents, obtenus avec la caséine entière. Cependant l'activité de la présure étudiée par la mesure de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 5 p. 100 ne suit pas ces variations (fig 13).

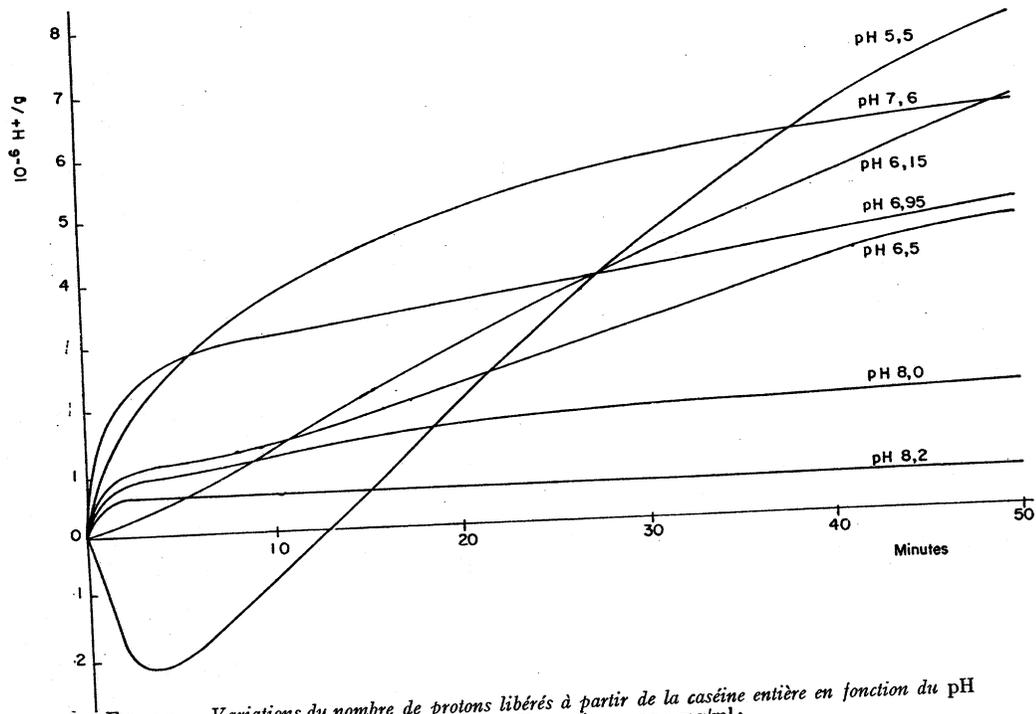


FIG. 12. — Variations du nombre de protons libérés à partir de la caséine entière en fonction du pH
 Concentration en caséine $s = 15,2$ mg/ml sauf à pH 5,5 où $s = 17,9$ mg/ml;
 Concentration en présure $e = 0,35$ U. P./ml ($4,2$ γ /ml), sauf à pH 5,5 où $e = 0,09$ U. P./ml ($1,0$ γ /ml);
 Température : 25°C ; NaCl = $0,1$ M.
 En ordonnées : protons libérés exprimés en mole de H^+ par gramme de caséine entière ;
 En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

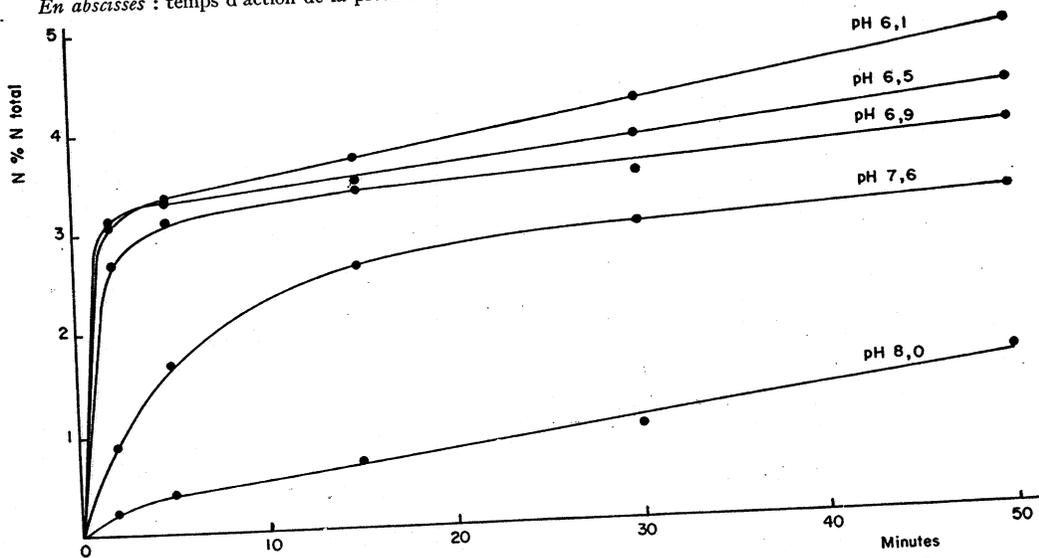


FIG. 13. — Variations de l'azote soluble dans 5 p. 100 d'acide trichloracétique au cours de l'hydrolyse de la caséine entière par la présure à différents pH
 Conditions identiques à celles de la figure 12.
 En ordonnées : augmentation de l'azote soluble en pourcent de l'azote total ;
 En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

IV — CONCLUSION — NATURE DE LA LIAISON ROMPUE PAR LA PRÉSURE

Lors de l'hydrolyse de la caséine α par la présure nous avons mis en évidence une relation linéaire entre les protons libérés mesurés par titrimétrie et l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 ou caséino-glycopeptide. Ceci indique bien qu'en suivant le nombre de protons libérés, on suit également la libération du caséino-glycopeptide et qu'il peut s'agir par suite de la même réaction.

D'autre part, nous avons trouvé qu'il y a dans la caséine entière une relation linéaire entre la libération de ce caséino-glycopeptide et la sensibilité de la caséine au calcium comme si la coagulation était la conséquence du départ du caséino-glycopeptide libéré par la présure à partir de la caséine α contenue dans la caséine entière.

Nous pouvons donc relier la mesure des protons libérés à l'activité coagulante de la présure.

La mesure des protons libérés par la méthode titrimétrique à pH constant se prête bien à une étude cinétique : c'est une méthode rapide, pouvant se faire sur de petites quantités de protéine, et relativement précise étant donné la faible protéolyse mise en jeu. Elle nous permet d'interpréter le nombre et la nature des liaisons rompues par la présure en supposant que les protons libérés proviennent directement de la coupure d'une liaison covalente à groupement ionisable. Certes, il est possible qu'une liaison covalente à groupement non ionisable dans nos conditions expérimentales soit coupée et que cette coupure entraîne une réorganisation de structure de la caséine α avec apparition d'un nouveau groupe ionisable précédemment masqué. Mais ceci nous paraît moins vraisemblable, car cette liaison ne peut être ni une liaison ester, ni une liaison peptidique habituelle, ni non plus une liaison disulfure car il n'y a pas d'acides aminés soufrés dans le caséino-glycopeptide (NITSCHMANN et HENZI 1959, NITSCHMANN et BEEBY 1960, JOLLES et ALAIS, 1961).

Nous avons constaté que, dans la zone de pH comprise entre 5,4 et 7,4, le nombre de groupes titrés ne varie pas, compte tenu de la précision de nos mesures (tabl. 1). Parallèlement, nous avons vérifié que la quantité totale de caséino-glycopeptide ne variait pas non plus, observation qui confirme celle de NITSCHMANN et BOHREN (1955) pour la caséine entière. Le pK moyen des groupes titrés est donc inférieur à 5, sinon on observerait une variation, plus grande que l'erreur expérimentale, du nombre de groupes titrés en fonction du pH. De même, et toujours compte tenu de la précision de nos mesures, l'absence de libération de protons à pH 3,2 indique une valeur de pK supérieure ou égale à 4. La valeur du pK moyen des groupes titrés est donc comprise entre 4 et 5. Une telle valeur ne correspond pas à la dissociation d'un groupe α aminé pour lequel on ne connaît pas de pK inférieur à 6 d'après KLOTZ (1954), mais plutôt à la dissociation d'un groupe carboxyle dont le pK est au voisinage de 4 lorsque ce groupe est en position terminale ou sur une chaîne latérale d'une chaîne polypeptidique. On est ainsi conduit à penser que la présure coupe une liaison de type ester dans laquelle le groupe carboxylique est le groupement ionisable. D'après JOLLES et ALAIS (1961) le caséino-glycopeptide a les mêmes acides C terminaux que la caséine α ; il est donc situé dans la partie C terminale de la caséine α . De plus, ces auteurs n'ont pas trouvé d'acide aminé N terminal, confirmant les résultats de WAKE (1959) ; la liaison coupée

par la présure peut donc être constituée par le groupement carboxylique C terminal de la paracaséine κ et une fonction non ionisée telle qu'une fonction alcool du caséinoglycopeptide (sucre, sérine ou thréonine). Également d'après JOLLES et ALAIS (1962) cette partie C terminale de la paracaséine κ est constituée par la Phénylalanine et la Leucine. Cependant un seulement de ces deux acides aminés doit être l'acide aminé C terminal car l'apparition de deux C terminaux nous semble incompatible avec le petit nombre de groupes carboxyliques que nous titrons. Récemment les mêmes auteurs (1962) ont signalé une similitude d'action entre l'hydrure double de lithium et de bore (LiBH_4) et la présure qui peut appuyer l'hypothèse de l'activité estérasique de la présure.

Étant donné le pK des groupes titrés, le nombre de protons mesurés à pH 6,95 en fin de réaction représente donc le nombre total de liaisons rompues par la présure. Ce nombre est faible puisqu'il correspond à $1 \pm 0,2$ N liaisons rompues pour 55 000 g de caséine κ , N étant le nombre d'AVOGADRO. Ceci correspond à la rupture d'une liaison pour deux monomères de caséine κ soit un dimère sans que nous puissions expliquer pourquoi une liaison est rompue par dimère et non par monomère de caséine κ . A pH neutre, d'après WAUGH (1958), la caséine κ est fortement polymérisée ($S_{20} = 13,6$ soit 16 à 37 monomères). Cependant, comme l'activité de la présure est à peu près la même, d'après ALAIS et *al.* (1953) dans des solutions de caséinate de sodium et dans le lait, on peut penser que le degré de polymérisation n'est pas un facteur limitant de la protéolyse, soit que la présure réagisse avec la forme monomère ou dimère en équilibre avec la forme polymère, soit que la polymérisation ne modifie pas le nombre de liaisons accessibles.

Le nombre de protons libérés par hydrolyse de la caséine entière est particulièrement petit et il est difficile d'interpréter la variation de ce nombre en fonction du pH étant donné les interactions possibles entre les divers constituants de la caséine, interactions que nous avons déjà signalées (GARNIER et *al.*, 1962).

Reçu pour publication en octobre 1962.

REMERCIEMENTS

Nous sommes reconnaissants à M. G. MOCQUOT, directeur de la Station centrale de Recherches laitières et de Technologie agricole des produits animaux (I. N. R. A.), Jouy-en-Josas, S.-et-O., France, et à M^{lle} J. YON, maître de recherches au Laboratoire de Biologie physico-chimique de la Faculté des Sciences, Paris, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux et les fructueuses discussions qu'ils ont bien voulu avoir avec nous.

Nous remercions C. ALAIS et B. FOLTMANN d'avoir si obligeamment mis à notre disposition la présure cristallisée.

SUMMARY

STUDY OF RENNIN ACTION ON CASEIN BY TITRIMETRIC METHOD AT CONSTANT pH. COMPARISON WITH OTHER METHODS

The titrimetric method at constant pH has been applied to the hydrolysis of whole casein and κ -casein by crystalline rennin. κ -casein appears to be very sensitive to rennin action compared to whole casein. This activity on κ -casein is marked by the appearance of a new titratable group of a pK between 4 and 5. The significance of the appearance of such a group is discussed and the confrontation between known experimental facts on rennin activity makes very likely that rennin

splits in κ -casein an ester bond and that consequently rennin behaves as an esterase. The number of ester bonds split during rennin action has been estimated to 1 ± 0.2 N ester bond per 55 000 g of κ -casein. This number is rather small compared to the known molecular weight of the monomer of κ -casein i. e. 26 000. Till now, no clear reason has been found to explain this discrepancy. A linear relationship has been demonstrated between the amount of caseino-glycopeptide released and the sensitivity of whole casein to calcium ions for one part and the number of ester bonds split in κ -casein for another part. In other words, the esterase activity of rennin on κ -casein is strickly related to the clotting activity of this enzyme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALAIS C., 1955. Préparation de présure cristallisée à partir d'estomacs de veaux (caillettes). *Ann. Technol. agric.*, **4**, 113-120.
- ALAIS C., 1956. Etude des substances azotées non protéiques (N. P. N.) séparées de la caséine du lait de vache sous l'action de la présure.. *XIV^e Congr. Int. Laiterie*, **2**, 823-839.
- ALAIS C., MOCOQUOT G., NITSCHMANN Hs., ZAHLER P., 1953. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. VII. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus Casein durch Lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. *Helv. chim. Acta*, **36**, 1955-1968.
- BERRIDGE N. J., 1945. The purification and crystallization of rennin. *Biochem. J.*, **39**, 179-186.
- BRUNNER J. R., THOMPSON M. P., 1959. Some characteristics of the glyco-macropptide of casein. A product of the primary rennin action. *J. Dairy Sci.*, **42**, 1881-1883.
- GARNIER J., 1957. Fraction protéique dégradée spécifiquement par la présure dans la caséine. *Int. Symp. on Enzyme Chem., Tokyo and Kyoto*, 524-526.
- GARNIER J., 1958. Protéolyse de la caséine par la présure. Application de la méthode potentiométrique à pH 7. *C. R. Acad. Sci.*, **247**, 1515-1518.
- GARNIER J., MOCOQUOT G., BRIGNON G., 1962. Action de la présure sur la caséine κ . Applications de la méthode titrimétrique à pH constant. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, 372-374.
- HAMMARSTEN O., 1883. Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. *Z. Physiol. Chem.*, **7**, 227-273.
- HIPP N. J., GROVES M. L., CUSTER J. H., McMEEKIN T. L., 1952. Separation of α , β and γ casein. *J. Dairy Sci.*, **35**, 272-281.
- Von HIPPEL P. H., WAUGH D. F., 1955. Casein : monomers and polymers. *J. am. Chem. Soc.*, **77**, 4311-4319.
- JOLLES P., ALAIS C., JOLLES J., — ALAIS C., JOLLES P., 1961. Étude comparée des caséino-glycopeptides formés par action de la présure sur les caséines de Vache, de Brebis et de Chèvre. I. Étude de la partie peptidique. II. Étude de la partie glucidique. *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**, 309-314, 315-322.
- JOLLES P., ALAIS C., JOLLES J., 1962. Amino acid composition of κ -casein and terminal amino acids of κ and para κ -casein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 56-57.
- JOLLES P., ALAIS C., JOLLES J., 1962. Contribution to the determination of the rennin sensitive linkage in κ -casein. *Biochem. J.*, **84**, 71 p.
- KLOTZ I. M., 1954. *A symposium on the mechanism of enzyme action*. John Hopkins Press.
- McKENZIE H. A., WAKE R. G., 1959. Studies of casein. *Aust. J. Chem.*, **12**, 712.
- McKENZIE H. A., WAKE R. G., 1961. An improved method for the isolation of κ -casein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **47**, 240-242.
- MATTENHEIMER H., NITSCHMANN Hs., 1955. Die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus Casein durch verschiedene proteolytische Fermente, verglichen mit der Abspaltung durch Lab. *Helv. chim. Acta.*, **38**, 687-698.
- MOCOQUOT G., ALAIS C., CHEVALIER R., 1954. Étude sur les défauts de coagulation du lait par la présure. *Ann. Technol. Agric.*, **1**, 1-44.
- NITSCHMANN Hs., BEEBY R., 1960. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. XIV. Aminosäurezusammensetzung des aus κ -casein durch Lab in Freiheit gesetzten Glykomakropeptid. *Chimia*, **14**, 318-319.
- NITSCHMANN Hs., BOHREN H. U., 1955. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. Eine Methode zur direkten Bestimmung der Geschwindigkeit des Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. *Helv. chim. Acta.*, **38**, 1953-1963.
- NITSCHMANN Hs., HENZI R., 1957. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. XIII. Untersuchung der bei der Labung in Freiheit gesetzten Peptide. *Helv. chim. Acta.*, **42**, 1985-1995.
- NITSCHMANN Hs., KELLER W., 1955. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. IX. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus isoliertem α und β Casein durch Lab. *Helv. chim. Acta.*, **38**, 942-946.

J. GARNIER

- NITSCHMANN Hs., WISSMANN H., HENZI R., 1957. Über ein Glyko-Makropeptid ein spaltprodukt des Caseins, erhalten durch Einwirkung von Lab. *Chimia*, **11**, 76.
- SCHWANDER H., ZÄHLER P., NITSCHMANN Hs., 1952. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. V. Analytische Untersuchungen an Kristallisiertem Lab. *Helv. chim. Acta.*, **35**, 553-560.
- STORCH J., SEGELCKE Th., 1874. Versuche über das Gerinnen der Milch. *Milchztg.*, **3**, 997.
- WAKE R. G., 1957. The action of Rennin on casein. *Aust. J. Sci.*, **20**, 167-168.
- WAKE R. G., 1959. V. The action of Rennin on casein. *Aust. J. Biol., Sci.* **12**, 479-489.
- WALEY S. G., WATSON J., 1953. The action of Trypsin on Polylysine. *Biochem. J.*, **55**, 328.
- WAUGH D. F., 1958. The interactions of α - β - and κ -caseins in micelle formations. *Faraday Soc. Discuss.*, **25**, 186-192.